



TITLE:

レトロウイルス、レンチウイルス
によって導入したFRETバイオセン
サーのYFPとCFP間で生じる組換え
の定量的解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

小松原, 晃

CITATION:

小松原, 晃. レトロウイルス、レンチウイルスによって導入したFRETバイオセンサーのYFPとCFP間で生じる組換えの定量的解析. 京都大学, 2017, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20529>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	小松原晃
論文題目	レトロウイルス、レンチウイルスによって導入したFRETバイオセンサーのYFPとCFP間で生じる組換えの定量的解析		
(論文内容の要旨)			
<p>フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理に基づくバイオセンサー (FRET バイオセンサー) は、生細胞内におけるシグナル分子活性の時空間変化を可視化できるという点において非常に有用である。FRET バイオセンサーは大きく、分子間 FRET バイオセンサー、分子内 FRET バイオセンサーの 2 つに区分できる。前者の分子間 FRET バイオセンサーは 2 つの別々の分子がそれぞれ FRET のドナー蛍光分子とアクセプター蛍光分子を有し、主として分子間の結合を FRET シグナルの増減として検出する。一方、後者の分子内 FRET バイオセンサーは一分子内に FRET のドナーとアクセプターの 2 つの蛍光分子を有し、FRET シグナルの増減は分子内の構造変化を反映する。分子間 FRET バイオセンサーに比べ、分子内 FRET バイオセンサーは総じて高い感受性を持っていること、遺伝子導入が容易であること、といった利点があり、現在は分子内 FRET バイオセンサーが専ら用いられている。これまでに、カルシウム、脂質、低分子量 GTP アーゼ、タンパク質リン酸化酵素といったシグナル分子を可視化する分子内 FRET バイオセンサーが多数開発されてきた。これら分子内 FRET バイオセンサーの大部分においては FRET 効率を高めるために、二量体化しやすいオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP) に由来するシアン色蛍光タンパク質 CFP と黄色蛍光タンパク質 YFP が用いられている。しかしながら、この CFP-YFP のペアをもつ FRET バイオセンサーをレトロウイルス、あるいはレンチウイルスによって遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立する上で技術的な問題が存在していた。それは遺伝子導入時に YFP 遺伝子と CFP 遺伝子間で高頻度に生じる遺伝子組換えである。これを解決するため、FRET バイオセンサーに含まれる YFP 遺伝子のアミノ酸配列を変えずに CFP 遺伝子との相同性を下げるようにコドン置換を行い、遺伝子組換えの回避を試みた。その結果、YFP 遺伝子の全長に渡ってコドン置換を行った場合ではレトロウイルス、レンチウイルスによる遺伝子導入時における組換えが観測されなかったのに対し、YFP 遺伝子の一部のみを置換した場合では組換えが生じた。さらに、YFP 遺伝子と CFP 遺伝子間の挿入遺伝子の塩基配列長が組換え効率に影響していることがわかった。これは、レトロウイルスやレンチウイルスゲノムの逆転写の過程において一分子内の遺伝子組換えが生じていることを示唆していた。これらの結果に基づき、鋳型切り替え (template switching) モデルに基づく数理モデルを構築してシミュレーションを行ったところ、実験結果を忠実に再現できることが分かった。本研究により、YFP 遺伝子と CFP 遺伝子の相同性を下げるコドン置換はレトロウイルス、レンチウイルスによる FRET バイオセンサーの導入において有用な方法であることが明らかになった。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、レトロウイルス、レンチウイルスで遺伝子導入した際に観察される遺伝子組換えの分子機構を研究したものである。申請者は、オワンクラゲ由来の *CFP* 遺伝子と *YFP* 遺伝子ペアを持つ FRET バイオセンサーの遺伝子組換えを蛍光タンパク質の蛍光波長を指標にして検討する系を用いた。レトロウイルス、またはレンチウイルスによる遺伝子導入の際に *YFP*、*CFP* 遺伝子のどの部位で、どの程度組換えが起きるのかを HeLa 細胞と A549 細胞を用いて定量的に解析した。その結果、*YFP* 遺伝子のコドン使用頻度を変化させ、*CFP* 遺伝子との相同性を *YFP* 遺伝子の全領域にわたって下げることにより、遺伝子組換えが起きなくなることを確認した。さらに *YFP* 遺伝子のコドン使用頻度をシステマティックに変えることで、様々な組換え体ができることを発見した。また、組換えが起きる遺伝子間のスパーサーの長さ、さらに相同配列長が組換え効率に重要であることも見出し、この結果から Template Switching モデルによる遺伝子組換えが生じていることを提案している。最後に、数理モデルと数値計算、統計解析から、組換え効率が約 0.002-0.005 /bp であることを導きだしており、この値は過去の報告ともよく一致していた。

本論文は、論理的かつ一貫性をもって記述されており、レトロウイルス、レンチウイルスによる遺伝子導入の分子機構について新しい知見を加えており、FRET バイオセンサーの安定的な遺伝子発現法の開発と応用の一助となる研究である。また、その内容は申請者の生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力を十分に示すものである。以上より、本論文を博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成29年1月31日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日